

蝶蛹金小蜂卵黄蛋白单克隆抗体的制备 及其应用方法的建立

董胜张¹, 高秀云¹, 程正贤², 胡 萃¹, 叶恭银^{1,*}

(1. 浙江大学昆虫科学研究所 杭州 310029; 2. 浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘要: 为深入研究寄生蜂卵黄发生及其内分泌调控, 特采用杂交瘤细胞技术, 制备 4 株能稳定分泌抗蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 卵黄蛋白(vitelin, Vt)的单克隆抗体(mAb), 即 PpVt mAb1, PpVt mAb2, PpVt mAb3 和 PpVt mAb4。这 4 株单克隆抗体的重链和轻链的亚类均分别为 IgG1 和 κ 类型, 不仅特异性识别 Vt, 而且识别雌蜂血淋巴中卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg), 但与雄蜂体液无反应。通过比较 4 种不同的 ELISA 方法, 确定了微量检测蝶蛹金小蜂体内 Vg/Vt 的最适 ELISA 法, 即双夹心 ELISA 法。该方法可用于单头雌蜂体内 Vg/Vt 的检测, 其检测灵敏度为 20 ng/mL。用 Western 免疫印迹的方法证实了该蜂 Vg 的合成始于刚羽化的成虫, 并在羽化后 12~36 h 内含量达到高峰。

关键词: 蝶蛹金小蜂; 卵黄蛋白; 单克隆抗体; 双夹心 ELISA

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)09-0871-07

Development of monoclonal antibodies to the vitellin in an endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) and its application methods

DONG Sheng-Zhang¹, GAO Xiu-Yun¹, CHENG Zheng-Xian², HU Cui¹, YE Gong-Yin^{1,*} (1. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: In order to study vitellogenesis and its endocrine regulation, we used hybridoma techniques and developed four monoclonal antibodies to *Pteromalus puparum* soluble yolk proteins, named as PpVt mAb1, PpVt mAb2, PpVt mAb3, and PpVt mAb4, respectively. The four antibodies, each with a IgG1 heavy chain and a κ light chain, had high specificity and affinity not only to the ovarian vitellin(Vt), but also to female hemolymph vitellogenin(Vg). However, they showed no immunological reaction with the male substances. The indirect double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was regarded as the most sensitive and accurate to measure Vg/Vt in the wasps, compared with other three methods of ELISA, namely, direct, indirect and double antibody sandwich ELISA. With this ELISA method it is possible to detect the Vg/Vt titer in a single wasp with the sensitivity of 20 ng/mL. The Western blot analysis indicated that the Vg synthesis initiated just after eclosion, and peaked to high levels within 12 and 36 h after eclosion.

Key words: *Pteromalus puparum*; vitellin; monoclonal antibodies; indirect double antibody sandwich ELISA

昆虫卵黄发生一直是昆虫生理学研究的热点问题之一。迄今, 有关昆虫卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)及其受体或者卵黄蛋白(vitelin, Vt)的分子特性、卵黄发生的时间动态及其模式, 以及卵黄发生的

内分泌调控机理等已有许多研究(李乾君等, 1995; Sappington and Railhel, 1998; Swdvers *et al.*, 2005), 涉及的昆虫包括 11 目 80 余种(叶恭银等, 2000; Swdvers *et al.*, 2005)。然而, 有关膜翅目寄生蜂类

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270899); 国家“973”项目(2006CB102005); 教育部优秀人才支持计划(NCET-05-0513)

作者简介: 董胜张, 男, 1979 年 6 月生, 安徽六安人, 博士, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: dong_shzhang@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: chu@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-03-13; 接受日期 Accepted: 2007-07-06

群的研究则甚少,仅有日本瘤姬蜂 *Pimpla nipponica* (Nose *et al.*, 1997)和温室粉虱蚜小蜂 *Encarsia formosa* (Donnell, 2004)的 V_g 基因序列及其与其他昆虫 V_g 基因同源性比较的报道,而乏对其卵黄发生及其内分泌调控的报道(Quicke, 1997)。究其原因可能与寄生蜂个体小,制备寄生蜂 V_g 或 V_t 多克隆抗体难以获得足够量的抗原,单头蜂体内 V_g 含量相对难以检测等有关。考虑到单克隆抗体具有特异性强、检测灵敏度高、制备时对抗原的量和纯度要求不高等优点,我们以菜粉蝶 *Pieris rapae* 蛹期优势寄生蜂——蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 为研究对象,在明确其雌蜂拥有 V_g (Sun *et al.*, 2001)的基础上,制备了其 V_t 的单克隆抗体,进而建立了可用于单头雌蜂 V_g 或 V_t 检测的高灵敏度的双夹心 ELISA 的方法,使开展该蜂卵黄发生及其内分泌调控等研究成了可能。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂系本实验室继代饲养,菜粉蝶幼虫采自杭州郊外,室内饲养至化蛹,化蛹后 2 天作为蝶蛹金小蜂的寄主。接蜂、寄生方法见张忠等(2004)。寄生后置入人工气候室($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 10L:14D)保育。

1.2 抗原的制备

解剖蝶蛹金小蜂雌蜂卵巢,取成熟卵置于 Eppendorf 离心管中,再加一定量的磷酸盐缓冲液(PBS)(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.4 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.4, 另含 0.1 mmol/L PMSF)于冰浴中研磨。之后,于 4°C , $10\,000 \times g$ 条件下离心 10 min,取上清液。用 Bradford (1976)法测定上清液中蛋白质浓度,置 -80°C 冰箱中保存备用,以作免疫的抗原。

1.3 单克隆单体的制备

免疫动物为 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠。首次将 $50\,\mu\text{g}$ 抗原与等体积的弗氏完全佐剂乳化得混合物进行腹腔注射。此后,每隔 2 周分别进行第二、三次腹腔注射免疫,免疫时将 $50\,\mu\text{g}$ 抗原与等体积的弗氏不完全佐剂乳化混合;再 2 周后进行最后一次加强免疫,用不含佐剂的 $100\,\mu\text{g}$ 抗原。免疫 3 天后,取其脾细胞与呈对数增长期的骨髓瘤细胞 SP2/0 以 1:6 的比例在 50% 聚乙二醇(PEG)3000 作用下进行融合。融合后的细胞首先在 HAT 培养基中培养,然

后用 HT 培养基筛选杂交瘤细胞。以结合采用 Sephadex G-100 分子筛和 UNO™ Q1 离子交换柱分离制备得的纯 V_t 为抗原,首先用间接 ELISA 法(徐宜为, 1991)筛选出阳性克隆。而后扩大培养,再以 Western 免疫印迹法验证确定能否分泌特异性识别 V_t 抗体的杂交瘤细胞。最后,对这些克隆作进一步扩大培养,制备单克隆抗体腹水(Liddell and Cryer, 1991),再分别将腹水按 10 倍系列稀释,以纯化的 V_t 为抗原,用间接 ELISA 法确定各抗体效价。

1.4 单克隆抗体的纯化

采用硫酸铵沉淀和 DEAE-纤维素(Sigma)离子交换层析纯化小鼠腹水。取 2 mL 腹水, $10\,000 \times g$ 离心 30 min,除去细胞碎片,取上清液,边搅拌边慢慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液(SAS),将溶液放在磁力搅拌器上 4°C 搅拌过夜,使蛋白质充分沉淀。蛋白质溶液 $10\,000 \times g$ 离心 30 min(4°C),弃上清,沉淀溶于 2 mL PBS 中,然后在 PBS 中透析 24 h(4°C),期间换液数次。将处理好的 DEAE-纤维素悬浮于缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 35 mmol/L NaCl, pH 8.8)中,装入层析柱($\varnothing 2.5\text{ cm} \times 20\text{ cm}$),用同种缓冲液平衡后,采用 Duo-Flow 系统(Bio-Rad),上样 2 mL,以 0.035 mol/L ~ 0.5 mol/L NaCl 进行线性洗脱,收集体积为 2 mL,流速为 1 mL/min, 280 nm 波长进行检测。

1.5 抗体 IgG 亚类的确定及其酶标抗体的制备

单克隆抗体重链和轻链类型的确定采用双夹心 ELISA 的方法,具体的操作按照 Southern Biotechnology 公司的 Goat Anti-Mouse IgG(H + L chain specific)试剂盒的说明书进行。标记碱性磷酸酶的抗体制备采用戊二醛法(朱立平和陈学清, 2000)。

1.6 多克隆抗体的纯化

抗 V_t 的多克隆抗体由实验室制备保存(Sun *et al.*, 2001)。使用前,以 A PROSEP-A Spin Columns (Millipore)纯化抗血清,操作步骤按照说明书进行。

1.7 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹

成虫刚羽化时,参照 Wu 和 Ma(1986)每隔 12 h 取其血淋巴,溶解在 PBS 中, $10\,000 \times g$, 4°C , 离心 5 min,吸取上清,测定蛋白浓度后,与等体积的 $2 \times$ SDS 上样缓冲液(0.0625 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8; 1% SDS, 10% 甘油, 5% β -巯基乙醇, 0.002% 溴酚蓝)混合,沸水中煮 5 min。处理好的样品经 8% 分离胶 SDS-PAGE 后,用考马斯亮蓝 R250(0.25% R250,

50% 甲醇, 10% 乙酸)染色,脱色液为 10% 甲醇和 10% 乙酸。SDS-PAGE 后采用 Bio-Rad 公司的半干电转膜系统,在 20 V 恒压下,转移 16 min,所用的膜为硝酸纤维素膜(Millipore)。转膜后在 5% 脱脂奶粉室温包被 1 h, PBST(PBS, 0.05% Tween-20)洗 3 次后,加入用包被液 1:50 000 稀释的 PpVt mAb1 室温反应 2 h, PBST 洗 3 次后,加入用包被液 1:10 000 稀释的羊抗小鼠 IgG(Sigma)室温反应 1 h, PBST 洗 3 次后,用 3', 3', 5', 5-四甲基联苯胺(简称 TMB)(Promega)显色。

1.8 四种 ELISA 方法检测效果的比较

ELISA 主要参考徐宜为(1991)的方法,并做部分改进。

(1)直接 ELISA: ① 用 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 碳酸盐包被缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.6)将纯化的蝶蛹金小蜂的 V_t 自 10 至 20 480 倍(20.7 ~ 44 000 ng/mL 抗原蛋白)进行倍比稀释后包被酶标板(NUNC, Denmark),每孔 100 μL , 4℃ 包被过夜; ② 用 TBS-T(20 mmol/L Tris, pH 7.5; 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20)洗 1 次后,用 1% 牛血清蛋白(BSA)100 μL 37℃ 封闭 30 min; ③ 用 TBS-T 洗 3 次; ④ 每孔加入 1% BSA 的 1:100 000 稀释的碱性磷酸酶标记的单克隆抗体 100 μL , 37℃ 反应 1 h; ⑤ 用 TBS-T 洗 3 次,然后加新配的底物(1 mg/mL 对硝基苯磷酸二钠, PNPP)100 μL , 37℃ 反应 0.5 h; ⑥ 加 50 μL 的 10% NaOH 终止反应,立即用 BIO-TEK[®] 酶标仪于 405 nm 波长测吸收值。

(2)间接 ELISA: ① ~ ③ 同直接 ELISA 的 ① ~ ③; ④ 每孔加入用封闭液 1:100 000 稀释的单克隆抗体, 37℃ 反应 1 h; ⑤ 同 ③ 洗涤; ⑥ 每孔加入用 0.6% BSA 的 1:50 000 倍稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗兔酶标抗体(Sigma)100 μL , 37℃ 反应 1 h; ⑦ ~ ⑧ 同直接 ELISA 的 ⑤ ~ ⑥。

(3)异种单抗夹心 ELISA: ① 用包被缓冲液 1:500 倍稀释的 PpVt mAb4, 每孔 100 μL , 4℃ 包被过夜; ② ~ ③ 同直接 ELISA 的 ② ~ ③; ④ 用 TBST 将纯化的蝶蛹金小蜂的 V_t 从 10 至 20 480 倍(20.7 ~ 44 000 ng/mL 抗原蛋白)进行倍比稀释, 每孔加入 100 μL , 37℃ 反应 1 h; ⑤ ~ ⑧ 同间接 ELISA 的 ④ ~ ⑧。

(4)双夹心 ELISA: 除了 ⑤ 加入用封闭液 1:10 000 稀释的纯化的兔源多克隆抗体, 37℃ 反应 1 h, 其他操作步骤同异种单抗夹心 ELISA。

标准曲线的分析参照杨利国等(1998)的方法。根据 V_t 浓度及其对应 OD_{405} 值间直观曲线呈指数函数的关系, 首先以 V_t 浓度的对数值($\lg x$)为横坐标, OD_{405} 值为纵坐标, 建立 $y\text{-}\lg x$ 曲线。以 Logistic 曲线和直线拟合 $y\text{-}\lg x$ 曲线, 其中拟合直线时仅对曲线中线性关系最佳的区域进行分析, 要求线性决定系数(r^2) ≥ 0.98 ; 依据拟合得各方法的 $y\text{-}\lg x$ 直线, 假定 $y = 0$ 时, 计算其对应的 $\lg x$ 值, 再转成 x 值, 即为各方法检测起始浓度的阈值(即只有当待测样品中 V_t 浓度大于此值时, 方可用标准线性方程计算样品浓度)。以阴性对照 OD_{405} 值的平均数减去其两倍标准差(SD) 从 $y\text{-}\lg x$ 曲线上查出对应的浓度对数, 再折算成浓度, 即为检测灵敏度。

1.9 数据分析

方差分析和多重比较均采用 DPS 软件(Version 8.1)(<http://www.chinadps.net>) 唐启义和冯明光, 2007)。

2 结果与分析

2.1 分泌抗 V_t 单克隆抗体的杂交瘤细胞株的建立

首次融合后, 共获得杂交瘤细胞克隆 246 个。经检测阳性克隆有 84 个, 其中强阳性 15 个, 占阳性克隆的 17.8%。用有限稀释法对强阳性克隆的进一步克隆化培养, 经 3 次连续的克隆筛选, 最后获得 4 株能稳定分泌抗蝶蛹金小蜂 V_t 的杂交瘤细胞系, 即 PpVt mAb1, PpVt mAb2, PpVt mAb3 和 PpVt mAb4。分别制取了腹水, ELISA 测定腹水上清的效价均达到 10^5 以上。

2.2 抗 V_t 单克隆抗体的纯化

单克隆抗体腹水经过硫酸铵沉淀后, 在过 DEAE-纤维素层析柱, 经过 0.035 ~ 0.5 mol/L NaCl 线性梯度洗脱时, 基本上只有一个主峰(图 1), 通过 ELISA 测定和 Western 免疫印迹验证, 该峰即为纯化的抗体。通过对纯化过程中腹水的 SDS-PAGE 分析发现, 腹水经过硫酸铵沉淀后条带很多, 经过阴离子交换后, 只有重链和轻链, 根据分子量标准, 推测其分子量各为 56 kD 和 25 kD(图 2)。纯化得到的抗体的效价与腹水抗体相比未发生变化。

2.3 抗 V_t 单克隆抗体的特性

通过对 4 株单抗亚类的双夹心 ELISA 测定, 结果表明 4 株单抗的重链的亚类均为 IgG1, 而轻链为 κ 类型。通过戊二醛法成功地将碱性磷酸酶标记到

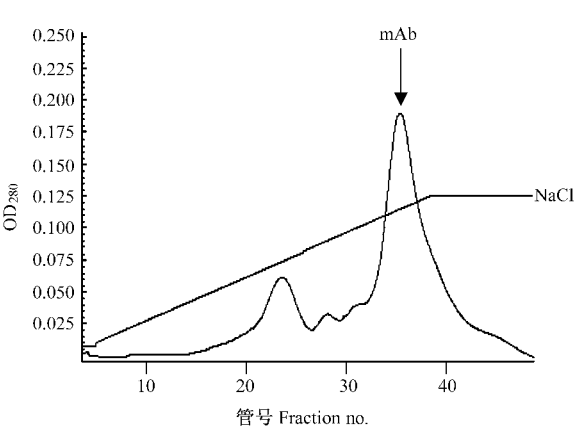


图 1 蝶蛹金小蜂卵黄蛋白单克隆抗体腹水经硫酸铵沉淀后的 DEAE-纤维素层析

Fig. 1 Elution profile of the ascites of monoclonal antibody against the Vt of *Pteromalus puparum* after ammonium sulfate precipitation on a DEAE-cellulose

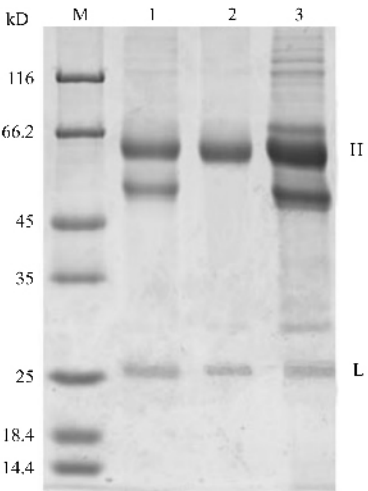


图 2 蝶蛹金小蜂卵黄蛋白单克隆抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the monoclonal antibody against the Vt of *Pteromalus puparum*

M : 低分子量标准 Low molecular standard ; 1 : 经硫酸铵沉淀后的腹水 The ascites after ammonium sulfate precipitation ; 2 : 经硫酸铵沉淀和 DEAE-纤维素层析得纯化抗体 The purified antibody after a combination of ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose chromatography ; 3 : 未纯化的腹水 Crude ascites ; H : IgG 重链 IgG heavy chain ; L : IgG 轻链 IgG light chain .

纯化的 PpVt mAb1 抗体上 , 经直接 ELISA 测定 , 其效价为 1:100 000。

以 PpVt mAb1 抗体为例的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果(图 3)表明 , 所制备的抗体具有明显的特异性 , 其仅与雌蜂的体液中 Vg 和卵内 Vt 呈现免疫反应 , 而与雄蜂的体液无任何反应 , 即所获得的抗体是特异性针对蝶蛹金小蜂 Vg 和 Vt 的 2 个分子量各为 206 kD 和 165 kD 亚基的。同时说明该蜂 Vg 和

Vt 具有免疫同源性。

此外 , 另外 3 株抗体(PpVt mAb2 , PpVt mAb3 和 PpVt mAb4)也可特异性识别卵内可溶性蛋白中 Vt 的 2 个分子量各为 206 kD 和 165 kD 亚基(图 4)。

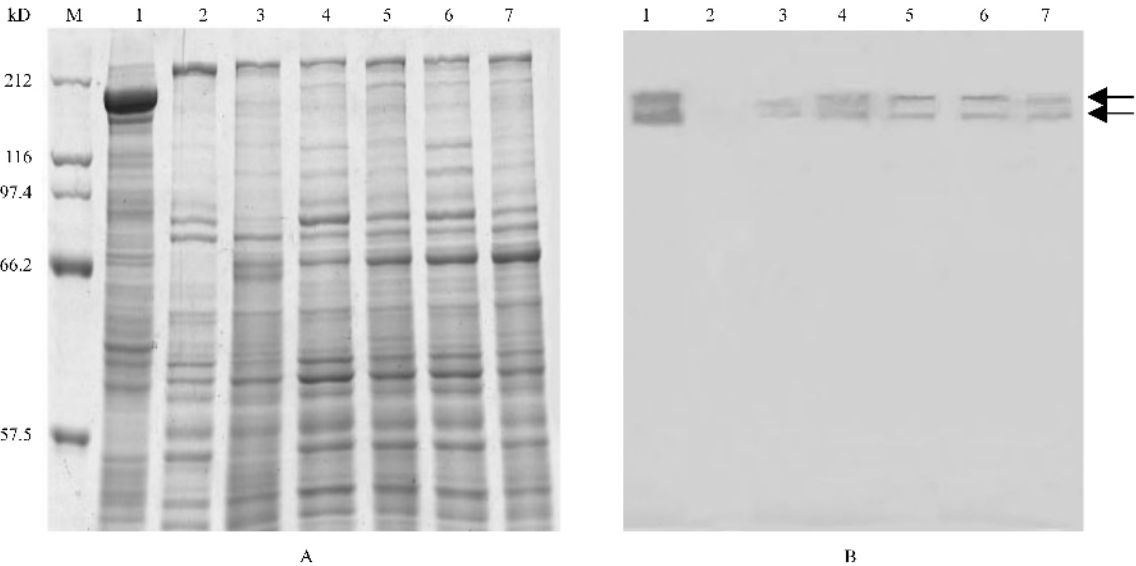


图 3 蝶蛹金小蜂卵和雌雄成峰血淋巴中可溶性蛋白的 SDS-PAGE(A)及 Western 免疫印迹分析(B)

Fig. 3 SDS-PAGE(A) and Western blot analysis(B) of soluble proteins from egg and male and female adult hemolymph in *Pteromalus puparum*

M : 高分子量标准 High molecular marker ; 1 : 卵内容物 Extract of egg in *P. puparum* ; 2 : 雄蜂血淋巴 Male adult hemolymph ; 3 ~ 7 : 羽化后 0、12、24、36 和 48 h 雌蜂血淋巴 The hemolymph samples of female adults 0 , 12 , 24 , 36 and 48 h after emergence ; 箭头表示 Vg 或卵黄蛋白的 2 个亚基 Arrows indicate two subunits of vitellin or vitellogenin .

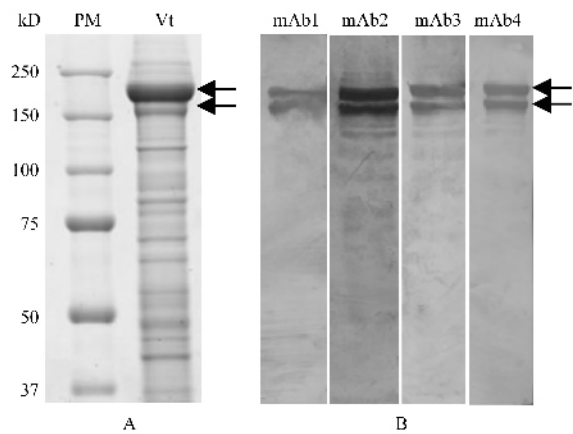


图4 蝶蛹金小蜂卵可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析(A)及其分别与 4 株单克隆抗体反应的 Western 免疫印迹分析(B)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the yolk soluble proteins including the Vt(A) and its corresponding Western blot analysis with four monoclonal antibodies against the Vt(B) in *Pteromalus puparum*
PM:预染的分子量标准(Bio-Rad) Prestained molecular marker (Bio-Rad); mAb1~4:分别示 4 株卵黄蛋白单克隆抗体 Each monoclonal antibody against the Vt; 箭头表示 Vt 的 2 个亚基 Arrows indicate two subunits of Vt.

2.4 抗 Vt 单克隆抗体的应用

2.4.1 Vt 的定性检测：以抗 Vt 单克隆抗体 ,结合 SDS-PAGE 和 Western blot 分析可用于蝶蛹金小蜂血淋巴中 Vg 滴度时间动态的定性检测(图 3)。从图中可知 ,该蜂 Vg 的合成从雌蜂刚羽化时开始 ,羽化后 12~36 h 内是合成高峰期 ,而到 48 h 时滴度明显下降。

2.4.2 Vt 的定量检测：以抗 Vt 单克隆抗体 ,结合 ELISA 法可用于蝶蛹金小蜂血淋巴中 Vg 或卵巢内 Vt 滴度时间动态的定量检测。4 种 ELISA 法检测得 OD₄₀₅ 值与 Vt 浓度对数间关系均能以 Logistic 曲线很好地加以拟合(图 5 和表 1)。但从 y-lgx 线性关系的 x 区间(图 5 和表 1) ,以及其可检测的起始浓度阈值(直接 ELISA、间接 ELISA、异种双抗夹心 ELISA 和双夹心 ELISA 各为 435.18、2 043.91、2 894.12、59.31 ng/mL)而言 ,4 种方法应以双夹心 ELISA 法为佳。从检测的灵敏度来看 ,也是双夹心 ELISA 最灵敏。可见 ,实际应用中应选用双夹心 ELISA。

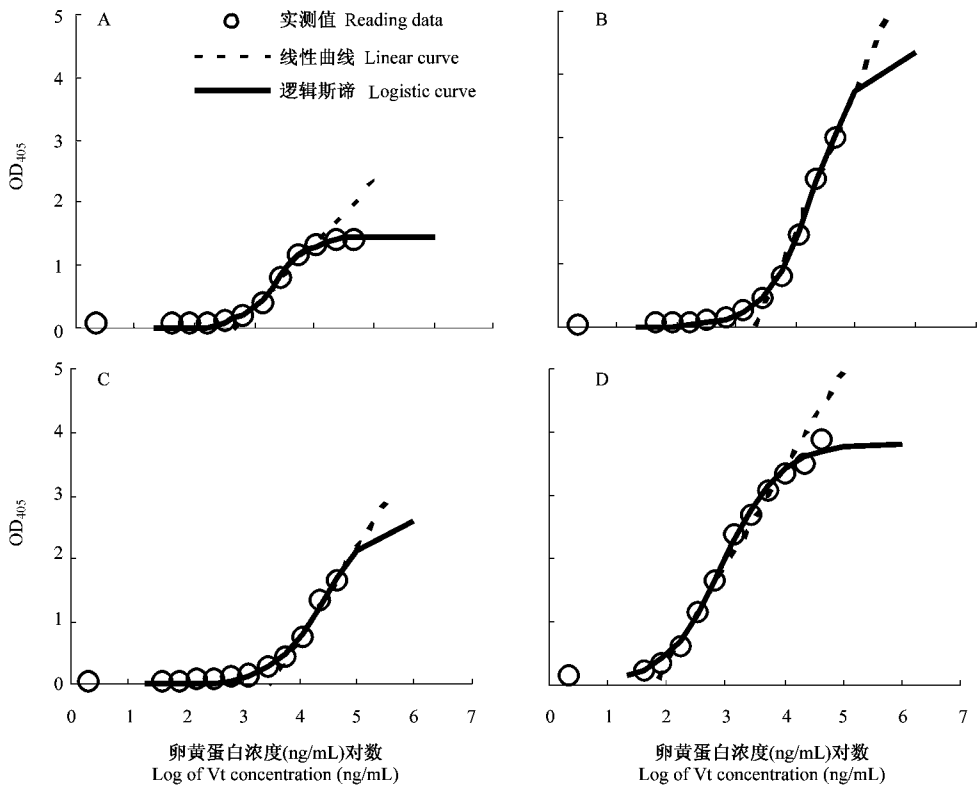


图5 4 种 ELISA 方法检测得蝶蛹金小蜂卵黄蛋白 OD₄₀₅ 值曲线的比较

Fig. 5 Curves of optical densities of *Pteromalus puparum* vitellin with different concentrations determined using four different ELISA methods

A、B、C 和 D 分别示直接 ELISA、间接 ELISA、异种单抗夹心 ELISA 和双夹心 ELISA。A , B , C 和 D indicate direct ELISA , indirect ELISA , double antibody sandwich ELISA and indirect double antibody sandwich ELISA , respectively.

以双夹心 ELISA 法可检测出单头或多头雌蜂体内 V_g 或 V_t 的总量或滴度,且当以单头雌蜂体内 V_g 或 V_t 滴度为单位时,以单头或多头雌蜂为样本所测的结果无显著差异,所测者也落于 y -lg x 标准线性

范围内(表 2)。可见,实际应用时完全可用该方法以单头雌蜂为样本进行检测,以更全面反映同一发育阶段个体间差异。

表 1 4 种 ELISA 方法有关方程与参数的比较

Table 1 Comparison of two equations describing the correlation between the values of OD ₄₀₅ and their corresponding logarithm values of the Vt concentration and parameters among four different ELISA methods			
测定方法 Assay method	Logistic 方程式 Logistic equation	线性方程式 Linear equation	灵敏度 Sensitivity (ng/mL)
直接 ELISA Direct ELISA	$y = 1.4751(1 + \exp(11.0656 - 3.2952x))$ ($r^2 = 0.9893$, $P = 0.0001$)	$y = 1.0085x - 2.6611$ ($r^2 = 0.9809$, $P = 0.0011$) $2.8212 \leq x \leq 4.0414 *$	160
间接 ELISA Indirect ELISA	$y = 4.4086(1 + \exp(10.5686 - 2.4517x))$ ($r^2 = 0.9972$, $P = 0.0001$)	$y = 2.2254x - 7.3671$ ($r^2 = 0.9823$, $P = 0.0010$) $3.4393 \leq x \leq 4.64352 *$	320
异种单抗夹心 ELISA Double antibody sandwich ELISA	$y = 2.6695(1 + \exp(9.9872 - 2.2647x))$ ($r^2 = 0.9863$, $P = 0.0001$)	$y = 1.4188x - 4.9112$ ($r^2 = 0.9829$, $P = 0.0085$) $3.7404 \leq x \leq 4.6435 *$	640
双夹心 ELISA Indirect double antibody sandwich ELISA	$y = 3.8357(1 + \exp(5.9407 - 2.0049x))$ ($r^2 = 0.9957$, $P = 0.0001$)	$y = 1.5434x - 2.7366$ ($r^2 = 0.9919$, $P = 0.0001$) $2.2191 \leq x \leq 4.0414 *$	20

注 Notes : y 为 OD₄₀₅ 值, x 为 V_t 浓度对数。 y indicates the OD₄₀₅ values , while x means the logarithm of the Vt concentration with 10 as its base number.

表 2 不同雌蜂个体体内卵黄(原)蛋白滴度的双夹心 ELISA 测定

Table 2 The titers of hemolymph vitellogenin and ovarian vitellin in different female individuals measured using indirect double antibody sandwich ELISA				
雌蜂个数 Number of female wasps(s)	血淋巴卵黄原蛋白 Hemolymph Vg		卵巢卵黄蛋白 Ovarian Vt	
	总量 (μg) Total level	滴度 ($\mu\text{g}/\text{雌蜂}$) Titer ($\mu\text{g}/\text{female}$)	总量 (μg) Total level	滴度 ($\mu\text{g}/\text{对卵巢}$) Titer ($\mu\text{g}/\text{pairs of ovaries}$)
1	0.5084 ± 0.0961 cB	0.5084 ± 0.0961 a	2.1617 ± 0.6936 cC	2.1617 ± 0.6936 a
2	0.9826 ± 0.2213 bA	0.4914 ± 0.1107 a	4.4001 ± 0.7100 bB	2.2001 ± 0.4402 a
3	1.3955 ± 0.2516 aA	0.4652 ± 0.0830 a	6.7554 ± 0.8805 aA	2.2518 ± 0.2367 a
	$F_{(2,14)} = 19.4580$, $P = 0.0005$	$F_{(2,14)} = 0.1990$, $P = 0.8230$	$F_{(2,14)} = 35.9660$, $P = 0.0001$	$F_{(2,14)} = 0.0340$, $P = 0.9671$

注 Notes : 数据为平均值 ± 标准差($n = 5$)。方差分析和 Duncan's 多重比较结果表明,同列中具相同大小写字母的数据间差异分别未达显著水平($P > 0.05$)和极显著水平($P > 0.01$)。The data are expressed as the mean ± SD ($n = 5$). Values followed by the same lowercase and uppercase letters in a column are not significantly different at $P > 0.05$ and $P > 0.01$ according to ANOVA and Duncan's multiple range tests , respectively.

3 讨论

本实验为了获得只与目标蛋白起免疫反应的单克隆抗体,采用先用杂蛋白作为抗原免疫,然后进行酶联免疫法(ELISA)筛选,筛选出的阳性克隆再进行 Western 免疫印迹验证,与目的蛋白起反应的细胞株,再进行克隆筛选,直到获得单个细胞系。用这种方法我们成功的制备了蝶蛹金小蜂卵黄蛋白的单克隆抗体,且具有很强的特异性。这种方法与常规方法相比,不必经过复杂而耗时的抗原蛋白的纯化,这对制备那些难以获得大量可供纯化蛋白混合的小型昆虫的某种特定蛋白抗体来说,确实是相当有效的。

对于个体较小的昆虫来说,研究其卵黄发生或降解,有一定的难度,因为不能用传统的方法来进行

这类昆虫体内卵黄蛋白的微量变化的检测。虽然可以设计卵黄原蛋白基因序列的特异性探针来检测体内卵黄原蛋白 mRNA 的量上的变化,但是这只是在转录水平上的变化,而对于卵黄蛋白的合成与吸收却不能明确,加上卵黄原蛋白转录后的修饰以及蛋白的糖基化和磷酸脂化,因而不能从 mRNA 上的变化来确定体内卵黄蛋白的变化(Wu and Ma , 1986)。在上世纪 80 年代以前,人们用放射免疫法(RIA)来检测蚊子体内的卵黄蛋白微量变化,但是这种方法耗时多,而且重复性差(Hagedorn *et al.* , 1978)。后来人们采用火箭免疫电泳的方法来检测蚊子体液中的卵黄原蛋白的含量变化,但是这种检测方法所需要的样品较多,而且检测的灵敏度不高,只有 10 mg/ mL(van Handel and Lea , 1984)。Ma 等(1984)首次制

备了黑须伊蚊 *Aedes atropalpus* 的单克隆抗体和多克隆抗体,并采用双夹心 ELISA 方法检测到单个蚊子体内的卵黄蛋白,且检测的灵敏度达到 100 ng/mL,比火箭免疫电泳的灵敏度提高了 100 倍。正因如此,后来该方法在蚊子(Ma *et al.*, 1984, 1986)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*(Wu and Ma, 1986)和变异革蜚 *Dermacentor variabilis*(Sankhon *et al.*, 1999) 等的 Vg/Vt 滴度动态及内分泌调控作用的研究中均得到了应用。

本实验成功建立了一种微量检测寄生蜂体内卵黄蛋白的精确方法,即双夹心 ELISA 方法。该方法与其他 ELISA 方法相比,既具有很高的灵敏度也具有较高的特异性,能够检测到 20 ng/mL 的卵黄蛋白的含量,完全可用于单头寄生蜂体内卵黄发生和卵黄蛋白的研究中。从蝶蛹金小蜂雌蜂不同发育阶段血淋巴的 Western 免疫印迹分析中发现,该蜂血淋巴 Vg 与卵内的 Vt 具有相同的抗原决定簇,都能与 PpVt mAb1 起反应,且由 2 个分子量分别约为 206 kD 和 165 kD 的亚基组成。该单克隆抗体的获得为揭示蝶蛹金小蜂的卵黄发生规律、卵黄蛋白的降解以及激素调控机理等提供了良好的研究方法保障。

参 考 文 献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248 – 254.

Donnell DM, 2004. Vitellogenin of the parasitoid wasp, *Encarsia formosa* (Hymenoptera : Aphelinidae) : Gene organization and differential use by members of the genus. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34 : 951 – 961.

Hagedorn HH, Kunkel JG, Wheelock G, 1978. The specificity of an anti-serum against mosquito vitellogenin and its use in a radioimmunological precipitation assay for protein synthesis. *J. Insect Physiol.*, 24 : 481 – 489.

Li QJ, Gong H, Guan ZH, 1995. Advances in insect vitellogenesis research. *Acta Entomol. Sin.*, 38(2) : 237 – 252. [李乾君, 龚和, 管致和, 1995. 昆虫卵黄发生研究进展. 昆虫学报, 38(2) : 237 – 252]

Liddell JE, Cryer A, 1991. A Practical Guide to Monoclonal Antibodies. Wiley, Chichester. 68 – 88.

Ma M, Newton PB, Gong H, Kelly TJ, Hsu HT, Masler EP, Borkovec AB, 1984. Development of monoclonal antibodies for monitoring *Aedes atropalpus* vitellogenesis. *J. Insect Physiol.*, 30 : 529 – 536.

Ma M, Gong H, Newton PB, Borkovec AB, 1986. Monitoring *Aedes aegypti* vitellogenin production and uptake with hybridoma antibodies. *J. Insect Physiol.*, 32 : 207 – 213.

Nose Y, Lee JM, Ueno T, Hatakeyamam M, Oishi K, 1997. Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla nipponica* (Hymenoptera : Apocrita : Ichneumonidae) : Vitellogenin primary

structure and evolutionary considerations. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27 : 1 047 – 1 056.

Quicke DIJ, 1997. Parasitic Wasps. London : Chapman & Hall. 154 – 166.

Sankhon N, Lockey T, Rosell RC, Rothschild M, Coons L, 1999. Effect of methoprene and 20-hydroxyecdysone on vitellogenin production in cultured fat bodies and backless explants from unfed female *Dermacentor variabilis*. *J. Insect Physiol.*, 45 : 755 – 761.

Sappington TW, Railhel AS, 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28 : 277 – 300.

Sun M, Ye GY, Hu C, 2001. Analysis of the soluble proteins in three species of parasitoids and molecular characteristics of yolk protein in *Pteromalus puparum*. *Entomologia Sinica*, 48(4) : 298 – 308.

Swdvers L, Raikhel AS, Sappington TW, Shirk P, Iatrou K, 2005. Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In : Gilbert LI, Iatrou K, Gill S eds. Comprehensive Molecular Insect Science. Vol. 1. Reproduction and Development. Oxford, UK : Elsevier Press. 87 – 155.

Tang QY, Feng MG, 2007. DPS[®] Data Processing System for Practical Statistics. Beijing : Science Press. [唐启义, 冯明光, 2007. 实用统计分析及其 DPS 数据统计分析系统. 北京 : 科学出版社]

van Handel E, Lea AO, 1984. Vitellogenin synthesis in blood-fed *Aedes aegypti* in the absence of the head, thorax and ovaries. *J. Insect Physiol.*, 30 : 871 – 875.

Wu S, Ma M, 1986. Hybridoma antibodies as specific probes to *Drosophila melanogaster* yolk polypeptides. *Insect Biochem.*, 16 : 789 – 795.

Xu YW, 1991. Technology of Immunology Detection. 2nd ed. Beijing : Science Press. 174 – 176. [徐宜为, 1991. 免疫检测技术. 第 2 版. 北京 : 科学出版社. 174 – 176]

Yang LG, Hu SC, Wei PH, Guo AZ, 1998. Technology of Immunoassay. Nanjing : Nanjing University Press. 279 – 284. [杨利国, 胡少昶, 魏平华, 郭爱珍, 1998. 酶免疫测定技术. 南京 : 南京大学出版社. 279 – 284]

Ye GY, Lu HP, Jiang CY, 2000. Diversity and phylogeny of yolk proteins in insects. In : Li DM ed. China Entomology towards 21st Century. Beijing : Chinese Science and Technology Press. 178 – 189. [叶恭银, 吕慧平, 蒋彩英, 2000. 昆虫卵黄蛋白分子的多样性与进化关系. 见 : 李典谟 主编. 走向二十一世纪的中国昆虫学. 北京 : 中国科学技术出版社. 178 – 189]

Zhang Z, Ye GY, Hu C, 2004. Effect of venom from two pteromalid wasps *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera : Pteromalidae) on the spreading, viability and encapsulation capacity of *Pieris rapae* hemocytes. *Acta Entomol. Sin.*, 47(5) : 551 – 561. [张忠, 叶恭银, 胡萃, 2004. 两种金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞延展、存活及包裹作用的影响. 昆虫学报, 47(5) : 551 – 561]

Zhu LP, Chen XQ, 2000. Methods of Immunological Assay. Beijing : People's Military Medical Press. 351 – 352. [朱立平, 陈学清, 2000. 免疫学常用实验方法. 北京 : 人民军医出版社. 351 – 352]

(责任编辑 : 黄玲巧)